

FR 99/01446

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **24 JUIN 1999**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

## DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE  
17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30



## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

**26 bis, rue de Saint Pétersbourg .  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30**

**Confirmation d'un dépôt par télécopie** ☐

**Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales**

Réservé à l'INPI <b>DATE DE REMISE DES PIÈCES</b> <b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b> <b>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT</b> <b>DATE DE DÉPÔT</b>		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  <b>CABINET LAVOIX</b> <b>2 Place d'Estienne d'Orves</b> <b>75441 PARIS CEDEX 09</b>									
<b>2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle</b> <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention <b>Établissement du rapport de recherche</b> <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non <b>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</b>  <p style="text-align: center;"><b>Procédé d'obtention d'amidon modifié.</b></p>		<b>n° du pouvoir permanent</b> <b>références du correspondant</b> <b>téléphone</b> <b>BFF 98/0267</b> <b>53-20-14-20</b> <b>date</b>									
<b>3 DEMANDEUR (S) n° SIREN</b> <b>Norm et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</b>  <p style="text-align: center;"><b>BIOGENNA</b></p>		<b>code APE-NAF</b>  <b>Forme juridique</b>									
<b>Nationalité (s)</b> <b>Adresse (s) complète (s)</b>  <p style="text-align: center;"><b>1 rue Edouard-Colonne 75001 PARIS</b></p>		<b>Pays</b>  <p style="text-align: center;"><b>FR</b></p>									
En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>											
<b>4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs</b> <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non    Si la réponse est non, fournir une désignation séparée											
<b>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b> <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission											
<b>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</b> <table style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>pays d'origine</th> <th>numéro</th> <th>date de dépôt</th> <th>nature de la demande</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="4" style="height: 100px;"></td> </tr> </tbody> </table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande				
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande								
<b>7 DIVISIONS</b> antérieures à la présente demande    n°    date    n°    date											
<b>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (nom et qualité du signataire) <b>CABINET LAVOIX</b> <b>M. OBLENSEK N° 92/1196</b>		<b>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION</b> <b>SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</b>									



La présente invention concerne un procédé d'obtention de plantes produisant un amidon modifié, l'amidon modifié extrait de ces plantes et les produits préparés à partir de cet amidon modifié.

5 L'amidon est le polyside de stockage énergétique chez les végétaux. Il constitue le principal apport calorique de l'alimentation animale et humaine et est également une source majeure de matière première végétale pour des utilisations non alimentaires. L'amidon est composé de deux fractions polysaccharidiques distinctes : l'amylose et l'amylopectine. L'amylose, qui représente la fraction minoritaire de l'amidon, est constitué de résidus glucose  
10 unis par des liaisons  $\alpha$ -1,4, et présente moins de 1% de ramifications. L'amylopectine, qui représente la fraction majoritaire de l'amidon, est constituée de résidus glucose unis par des liaisons  $\alpha$ -1,4, et présente environ 5% de ramifications, constituées par des résidus de glucose liés au polymère principal par une liaison  $\alpha$ -1,6. La distribution asymétrique de la ramification de  
15 l'amylopectine est responsable de la croissance illimitée des molécules et par conséquent des grains d'amidon, et rend également compte de la plupart des propriétés physico-chimiques de l'amidon.

La biosynthèse de l'amidon dépend d'une voie dont les étapes biochimiques principales sont la synthèse d'ADP-glucose suivie par le transfert  
20 de ce précurseur en position  $\alpha$ -1,4 sur un glucane par des (ADP-glucose :1,4- $\alpha$ -D-glucane 4- $\alpha$ -D-glucosyl)transférases, le polymère formé étant ramifié par l'action des enzymes dites de ramification ou de « branchement » : les 1,4- $\alpha$ -D-glucane 6- $\alpha$ -D-(1,4- $\alpha$ -D-glucano)-transférases. La figure 1 annexée est un schéma simplifié du métabolisme de l'amidon jusqu'à présent connu de l'homme  
25 du métier.

Par ailleurs les 4- $\alpha$ -D-glucanotransférases végétales, appelées également enzymes D pour « disproportionating enzymes » (« enzymes disproportionnantes ») sont connues pour catalyser le transfert de glucane d'une  
30 molécule 1,4- $\alpha$ -glucane vers une autre (transglycosylation intermoléculaire). Les règles d'action de l'enzyme D sur des substrats oligosaccharidiques sont schématisées comme suit :

Schéma : Exemple d'activité disproportionnante par l'enzyme D sur le maltotriose

5	Accepteur (n)	Donneur (x)	↔ Produit (n + 2)	+ Donneur -2
	*G-G-G <sub>OH</sub>	+ *G-G-G <sub>OH</sub>	↔ *G-G-G-G-G <sub>OH</sub>	+ *G <sub>OH</sub>
	*G-G-G-G-G <sub>OH</sub>	+ *G-G-G <sub>OH</sub>	↔ *G-G-G-G-G-G-G <sub>OH</sub>	+ *G <sub>OH</sub>
	*G-G-G <sub>OH</sub>	+ *G-G-G-G-G-G-G <sub>OH</sub>	↔ *G-G-G-G-G <sub>OH</sub>	+ *G-G-G-G-G <sub>OH</sub>
	*G-G-G-G-G <sub>OH</sub>	+ *G-G-G-G-G <sub>OH</sub>	↔ *G-G-G-G-G-G-G <sub>OH</sub>	+ *G-G-G <sub>OH</sub>

10

Le maltose ne peut servir de substrat donneur et seule une liaison à l'extrémité du maltotriose peut être attaquée. En outre, la première liaison du côté non-réducteur et l'avant-dernière liaison du côté réducteur sont résistantes à l'action de l'enzyme.

15

Takaha et al. ont rapporté au Congrès de l'AAB (Association of Applied Biologists) qui s'est tenu du 6 au 8 avril 1998, à Edimburgh, UK, (congrès sur le thème : « production et utilisation de l'amidon ») que des pommes de terre sans enzyme D poussaient plus lentement que les pommes de terre contrôles et que, malgré cela, la teneur en amidon présent dans les tubercules et sa composition apparaissaient normales en ce qui concerne notamment l'aspect des grains d'amidon en microscopie optique ou électronique, les proportions en amylose et amylopectine, le poids moléculaire de l'amylopectine débranchée et le nombre et la longueur des ramifications  $\alpha$ -1,6. Takaha et al. en ont conclu que l'enzyme D n'a pas un rôle direct sur les structures et les quantités d'amidon produit mais joue un rôle dans la croissance de la plante et son développement, l'amylopectine et l'amylose servant de molécules donneuses pour le transfert de maltooligosaccharide vers le glucose, permettant ainsi la dislocation et la solubilisation des grains d'amidon (Takada et al, 1998).

20

25

30

35

De manière surprenante, les auteurs de la présente invention ont découvert que les enzymes D sont en fait impliquées dans la biosynthèse de l'amidon, en transférant des oligosaccharides sur un précurseur de l'amylopectine. Les enzymes D peuvent en particulier transférer les oligosaccharides provenant du pool d'oligosaccharides produits *in vivo* par déramification du précurseur de l'amylopectine lors de la maturation de l'amylopectine. Les enzymes D peuvent notamment transférer les

oligosaccharides pouvant contenir par exemple de 2 à 20, en particulier de 2 à 6, résidus de glucose. La figure 2 annexée présente le rôle de l'enzyme D dans le cycle du métabolisme de l'amidon, tel que découvert par les auteurs de la présente invention.

5                    Cette découverte a été mise à profit pour modifier, en fonction du taux d'enzyme D active présent, la distribution des longueurs des chaînes de l'amylopectine, présent en particulier dans les organes de réserve des plantes. L'invention s'applique aussi au glycogène, présent en plus faible quantité que l'amylopectine dans les plantes mais que l'on peut trouver par exemple dans les  
10 grains de maïs doux, en permettant de la même façon la modification de la distribution de la longueur des chaînes de glycogène.

La présente invention a pour objet un procédé d'obtention de plantes ou parties de plantes produisant un amidon modifié dans lequel on  
15 augmente ou on diminue le taux d'expression d'enzyme D dans les cellules de plante, ledit amidon modifié différant de l'amidon produit naturellement par les plantes par la distribution des longueurs des chaînes de l'amylopectine.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, on diminue le taux d'expression d'enzyme D endogène, de façon à conduire à la production  
20 d'un amidon comprenant une amylopectine présentant un enrichissement en chaînes comportant moins de 6 résidus de glucose par rapport à un amidon produit naturellement. La diminution de l'expression d'une enzyme D endogène peut être notamment réalisée selon le procédé comprenant les étapes consistant à :

- 25                    a)     construire un vecteur d'expression comprenant un séquence nucléotidique antisens du gène codant pour ladite enzyme D endogène;
- b)     transformer une cellule de plante avec ledit vecteur d'expression ;
- 30                    c)     régénérer la plante à partir de la cellule transformée à l'étape b, ladite plante transgénique ainsi obtenu produisant un amidon comprenant une amylopectine dont la distribution des longueurs de chaînes est altérée, notamment dans le sens d'un enrichissement en chaînes comportant moins de 6 résidus de glucose.

De manière avantageuse, ladite cellule de plante transformée selon l'étape b) est également transformée par des séquences nucléotidiques antisens des gènes codant pour des enzymes affectant la répartition de la longueur des oligosaccharides produits lors du métabolisme de l'amidon, telles que les phosphorylases et les amylases.

Une autre possibilité pour réduire l'activité de l'enzyme D dans les cellules des plantes est d'exprimer des ribozymes qui sont des molécules d'ARN qui agissent comme des enzymes catalysant spécifiquement le clivage des transcrits codant pour l'enzyme D, par des techniques connues de l'homme du métier (EP 321 021).

Il est également possible d'obtenir une plante présentant une altération de l'expression d'enzyme D par le procédé dit "transwitch" décrit dans WO90/12084.

L'activité de l'enzyme D endogène peut également être réduite par mutagenèse des cellules de plante soit par irradiation U.V ou par un agent mutagène chimique, soit par insertion de transposons. Les éléments transposables ont la capacité de perturber l'expression de gènes dans lesquels ils sont insérés et de générer des délétions, réarrangements, et mutations au locus cible (McClintock et al., 1950).

Une technique de mutagenèse par transposons qui peut être avantageusement utilisée est la mutagenèse par transposon Mutator confirmée par un criblage en génétique inverse (Bensen et al., 1995) (Das et al., 1995). Cette technique met en œuvre les étapes consistant à croiser une lignée "Mutator" avec des hybrides des plantes d'intérêt puis à cribler les plantes F1 obtenues par PCR avec une amorce spécifique des transposons et une amorce spécifique de la séquence nucléotidique codant pour l'enzyme D. Les graines F2 obtenues à partir des plantes criblées F1 permettent d'obtenir des plantes dont le phénotype est alors analysé.

Selon un deuxième mode de réalisation de l'invention, on augmente le taux d'expression d'enzyme D dans la plante, de façon à conduire à la production d'un amidon comprenant une amylopectine présentant un enrichissement en chaînes comportant au moins 9 résidus de glucose par rapport à un amidon produit naturellement, ladite enzyme D étant identique à l'enzyme D endogène ou étant d'origine hétérologue.



L'augmentation du taux d'enzyme D peut être notamment réalisée selon le procédé comprenant les étapes consistant à :

- a) construire un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour une enzyme D, qui peut être une enzyme D identique à l'enzyme D endogène ou qui peut être d'origine hétérologue ;
- b) transformer une cellule de plante avec ledit vecteur d'expression ;
- c) régénérer la plante à partir de la cellule transformée à l'étape b), ladite plante transgénique ainsi obtenue produisant un amidon comprenant une amylopectine dont la distribution des longueurs de chaînes est altérée, notamment dans le sens d'un enrichissement en chaînes comportant au moins 9 résidus de glucose.

De manière avantageuse, ladite cellule de plante transformée selon l'étape b) est également transformée par des séquences nucléotidiques codant pour des enzymes affectant la répartition de la longueur des oligosaccharides produits lors du métabolisme de l'amidon, telles que les phosphorylases et les amylases.

Ladite séquence nucléotidique codant pour une enzyme D peut être une enzyme D d'origine hétérologue, telle que notamment une enzyme D choisie parmi l'enzyme D de la pomme de terre (Takaha et al, 1993) ou l'enzyme D de *Chlamydomonas reinhardtii* de 62 kD telle que définie ci-après.

La construction des vecteurs d'expression mentionnés ci-dessus est à la portée de l'homme du métier suivant les techniques standard. Lesdits vecteurs d'expression peuvent contenir une séquence nucléotidique antisens du gène codant pour ladite enzyme D endogène, selon le premier mode de réalisation de l'invention, ou une séquence nucléotidique codant pour une enzyme D, selon le deuxième mode de réalisation de l'invention. La séquence nucléotidique codant pour une enzyme D est associée aux éléments permettant son expression dans la plante, à savoir notamment un promoteur et un terminateur de transcription.

La transformation de cellules végétales peut être réalisée par transfert des vecteurs susmentionnés dans les protoplastes, notamment après

incubation de ces derniers dans une solution de polyéthylèneglycol en présence de cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par électroporation notamment selon la méthode décrite dans l'article de Fromm et al., 1986.

La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par utilisation d'un canon à gène permettant la projection, à très grande vitesse, de particules métalliques recouvertes des séquences d'ADN d'intérêt, délivrant ainsi des gènes à l'intérieur du noyau cellulaire, notamment selon la technique décrite dans l'article de Sanford, (1988).

Une autre méthode de transformation des cellules végétales, est celle de la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré du procédé de l'invention, les cellules végétales sont transformées par biolistique, c'est-à-dire par projection, au moyen d'un canon à particules, de microparticules recouvertes des séquences nucléotidiques à transférer (J. Finner, 1992).

Selon un autre mode de réalisation du procédé de l'invention, les cellules végétales sont transformées par un vecteur selon l'invention, ledit hôte cellulaire étant susceptible d'infecter lesdites cellules végétales en permettant l'intégration dans le génome de ces dernières, des séquences d'ADN d'intérêt initialement contenues dans le génome du vecteur susmentionné.

Avantageusement, l'hôte cellulaire susmentionné utilisé est *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon la méthode décrite dans l'article d'An et al., 1986, ou encore *Agrobacterium rhizogenes*, notamment selon la méthode décrite dans l'article de Jouanin et al., 1987.

De manière préférentielle, la transformation des cellules végétales est réalisée par le transfert de la région T du plasmide circulaire extra-chromosomique inducteur de tumeurs Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, en utilisant un système binaire (Watson et al.).

Pour ce faire, deux vecteurs sont construits. Dans un de ces vecteurs, la région d'ADN-T a été éliminée par délétion, à l'exception des bords droit et gauche, un gène marqueur étant inséré entre eux pour permettre la sélection dans les cellules de plantes. L'autre partenaire du système binaire est un plasmide Ti auxiliaire, plasmide modifié qui n'a plus d'ADN-T mais contient

toujours les gènes de virulence *vir*, nécessaires à la transformation de la cellule végétale. Ce plasmide est maintenu dans *Agrobacterium*.

Parmi les terminateurs de transcription pouvant être utilisés, on peut citer le terminateur polyA 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), décrit dans l'article de Franck et al., (1980), ou le terminateur polyA NOS, qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline (Depicker et al., 1982).

Parmi les promoteurs de transcription pouvant être utilisés, on peut citer notamment :

- le promoteur 35S, ou avantageusement le promoteur constitutif double 35S (pd35S) du CaMV, décrits dans l'article de Kay et al., 1987 ;
- le promoteur PCRU du gène de la cruciférine de radis permettant l'expression des séquences associées uniquement dans les semences (ou graines) de la plante transgénique obtenue ;
- les promoteurs PGEA1 et PGEA6 correspondant à la région 5' non codante des gènes de la protéine de réserve de graines, GEA1 et GEA6, respectivement, d'*Arabidopsis thaliana* (Gaubier et al., 1993) et permettant une expression spécifique dans les graines ;
- le promoteur chimérique super-promoteur PSP (Ni M et al., 1995), constitué de la fusion d'une triple répétition d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de l'octopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*, d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de la mannopine synthase et du promoteur mannopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* ;
- le promoteur actine du riz suivi de l'intron actine de riz (PAR-IAR) contenu dans le plasmide pAct1-F4 décrit par Mc Elroy et al., 1991 ;
- le promoteur HMGW (High Molecular Weight Glutenine) d'orge ;
- le promoteur du gène de  $\gamma$ zéine de maïs (P $\gamma$ zéine) contenu dans le plasmide p $\gamma$ 63, et permettant l'expression dans l'albumen des semences de maïs.

Parmi les cellules végétales susceptibles d'être transformées conformément à la présente invention, on peut citer celles de la pomme de terre, du blé, du maïs et du riz.

La présente invention a également pour objet une plante ou partie  
5 de plante telle que notamment la pomme de terre, le blé, le maïs ou le riz, produisant un amidon modifié différant de l'amidon produit naturellement par les plantes par la distribution des longueurs des chaînes de l'amylopectine, ladite plante ou partie de plante étant obtenue par le procédé de l'invention tel que décrit précédemment.

10 Par « partie de plante », on entend notamment les organes de réserve naturellement riches en amidon, tels que les graines ou les tubercules. Par « partie de plante », on entend également les cellules de ladite plante.

La présente invention a également pour objet un procédé  
15 d'obtention d'amidon modifié différant de l'amidon produit naturellement par les plantes par la distribution des longueurs des chaînes de l'amylopectine, dans lequel :

- on extrait l'amidon modifié à partir des plantes ou parties de plantes obtenues selon le procédé de l'invention, tel que décrit précédemment.
- ou on procède à l'extraction et à la solubilisation de l'amidon  
20 de plantes ou parties de plantes, puis on met en contact ledit amidon solubilisé avec une enzyme D, en présence de polysaccharides ou d'oligosaccharides éventuellement modifiés.

L'extraction de cet amidon est réalisée selon les techniques standard connues de l'homme du métier. La solubilisation de l'amidon est  
25 également connue de l'homme du métier et peut être réalisée par trempage et fractionnement du grain d'amidon (Whistler et al, (1967)), ou par exemple par chauffage. De manière alternative, on peut utiliser des enzymes destructurant l'amidon, telles que les amylases.

Selon un mode de réalisation de l'invention, on met en contact ledit  
30 amidon solubilisé avec une enzyme D en présence de saccharides. Lesdits saccharides peuvent être en particulier des oligosaccharides modifiés chimiquement, de façon à modifier les propriétés de l'amidon, par exemple sa digestibilité.

De manière avantageuse, on peut ajouter à l'enzyme D des enzymes affectant la répartition de la longueur des oligosaccharides produits lors du métabolisme de l'amidon, telles que les phosphorylases et les amylases.

Ladite enzyme D mise en contact avec l'amidon solubilisé peut provenir de la même espèce de plante que celle dont on extrait l'amidon ou peut avoir une origine hétérologue. On peut en particulier choisir l'enzyme D parmi l'enzyme D de la pomme de terre (Takaha et al, 1993) ou l'enzyme D de *Chlamydomonas reinhardtii* de 62 kD telle que définie ci-après. De manière avantageuse l'enzyme D utilisée est thermostable.

L'enzyme D de *Chlamydomonas reinhardtii* est purifiée par le procédé comprenant les étapes consistant à :

- centrifuger la souche *Chlamydomonas reinhardtii*;
- précipiter la fraction acellulaire au sulfate de protamine ;
- passer le surnageant obtenu à l'étape précédente sur une chromatographie d'échange d'anions ;
- soumettre la fraction non retenue à l'étape précédente à une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium ;
- soumettre le surnageant obtenu à l'étape précédente à une chromatographie de tamisage moléculaire ;
- concentrer par une chromatographie d'échange de cations le culot obtenu à l'étape précédente.

L'enzyme D de *Chlamydomonas reinhardtii* purifiée ainsi obtenue a un poids moléculaire de 62kD.

La présente invention a également pour objet l'amidon modifié différant de l'amidon produit naturellement par les plantes par la distribution des longueurs des chaînes de l'amylopectine, ledit amidon modifié étant obtenu par le procédé ci-dessus. En particulier l'amidon modifié obtenu par extraction et solubilisation de l'amidon de plantes ou parties de plantes, puis mise en contact dudit amidon solubilisé avec une enzyme D, éventuellement en présence de saccharides, comporte une amylopectine dont la distribution des longueurs des chaînes externes est modifiée par rapport à un amidon produit naturellement.

L'amidon modifié conformément à la présente invention peut être utilisé directement ou hydrolysé afin de produire des oligosaccharides d'intérêt (en particulier le glucose). L'obtention d'amidon modifié conformément à l'invention peut permettre de diminuer les quantités d'enzymes nécessaires pour une telle hydrolyse.

Par ailleurs, l'amidon modifié conformément à l'invention peut être utilisé lors de la fabrication de divers aliments, en particulier en tant qu'additif augmentant la viscosité ou favorisant la formation d'un gel.

L'amidon modifié conformément à l'invention peut également être utilisé dans de nombreuses industries : industrie du papier et du carton, industrie des adhésifs, industrie textile, industrie pharmaceutique (pour la formulation d s médicaments), etc.

L'amidon modifié conformément à l'invention peut également subir d'autres modifications, en particulier des modifications chimiques telles qu'un traitement acide, une oxydation, une estérification, etc avant son utilisation.

La présente invention a également pour objet l'utilisation de cet amidon modifié pour la préparation de produits dérivés, notamment de produits alimentaires.

La présente invention a également pour objet les produits ainsi préparés comprenant de l'amidon modifié différant de l'amidon produit naturellement par les plantes par la longueur des chaînes externes de l'amylopectine.

Les figures et exemples ci-après illustrent l'invention sans en limiter la portée.

5

### **LEGENDES DES FIGURES :**

La figure 1 représente un schéma simplifié du métabolisme de l'amidon jusqu'à présent connu de l'homme du métier.

Toutes les étapes décrites sont compartimentées dans le plaste.

10

①. Phosphoglucomutase

②. ADP-glucose pyrophosphorylase

③. Amidon synthétases solubles et liées

④. Enzymes de branchement

⑤. Phosphorylase

15

⑥. Amylases, enzymes de débranchement, maltases

⑦. Hexokinase

Glc=glucose ; Pi=phosphate inorganique

La figure 2 représente un schéma simplifié de la synthèse d'amylopectine, dans lequel est mis en évidence le rôle de l'enzyme D.

20

Toutes les étapes décrites sont compartimentées dans le plaste :

①. Conversion du G-6-P en G-1P par la phosphoglucomutase plastidiale

②. Synthèse du glycosylnucléotide précurseur ADP-glucose par l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase)

25

③. Elongation par les amidons synthétases solubles (SS)

④. ramification par les enzymes de branchement (BE)

⑤. débranchement par l'isoamylase (DBE) et libération d'oligosaccharides (MOS)

30

⑥. réinsertion des oligosaccharides produits par débranchement par l'enzyme D.

WSP=Polysaccharides solubles dans l'eau ;  
MOS=Maltooligosaccharides; G-6-P= glucose-6-phosphate ; Glc=glucose.

Le coût énergétique d'épissage par le DBE et l'enzyme D décrite dans cette invention est de 2 ATP par glucane clivé et réintroduit dans

l'amylopectine en ⑥ (WSP<sup>III</sup>). Ce coût découle de la réactivation du glucose produit par l'enzyme D en ADP-glucose. Le pointillé tracé à partir de WSP<sup>III</sup> illustre la possibilité offerte au polysaccharide de réserver de substrat d'élongation tant que la structure requise pour l'insolubilisation dans le grain n'aura pas été atteinte. L'entrée et la sortie du cycle sont illustrées par les flèches en traits gras et sont constituées d'une part par la synthèse d'ADP-glucose et d'autre part par la cristallisation et l'insolubilisation du polysaccharide à la surface du grain.

La synthèse d'amylose est postérieure à l'insolubilisation et se réalise exclusivement dans le granule.

La figure 3A représente la distribution des longueurs des oligosaccharides solubles non débranchés accumulés par la souche mutante JV45J de *Chlamydomonas reinhardtii*.

La figure 3B représente la distribution de longueurs des chaînes de l'amylopectine débranchée de la souche *Chlamydomonas reinhardtii* sauvage.

La figure 3C représente la distribution de longueurs des chaînes de l'amylopectine débranchée de la souche mutante JV45J *Chlamydomonas reinhardtii*.

La figure 3D représente la distribution de longueurs des chaînes de l'amylopectine débranchée de maïs « waxy » avec l'enzyme D pure de *Chlamydomonas reinhardtii* en l'absence d'oligosaccharides.

La figure 3E représente la distribution de longueurs du maltotriose incubé avec l'enzyme D pure de *Chlamydomonas reinhardtii*.

La figure 4 représente l'incorporation de maltooligosaccharides sur l'amylopectine de la souche sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii*.

### **EXEMPLES :**

Les auteurs de la présente invention ont étudié la biosynthèse de l'amidon à partir d'un modèle approprié : l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* (Buléon et al, 1997). En effet cet organisme unicellulaire stocke un amidon qui est identique à celui stocké dans l'endosperme des céréales et contient en outre les mêmes enzymes de biosynthèse de l'amidon.

Les auteurs de la présente invention ont sélectionné un nouveau mutant de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* accumulant de petits



oligosaccharides linéaires et présentant un taux de synthèse d'amidon réduit de 90% (Exempl 1).

L'amidon résiduel comporte une structure modifiée nouvelle caractérisée par un enrichissement en amylose et par une amylopectine dont les chaînes ultra-courtes (environ 2, 3, ou 4 résidus de glucose) sont surabondantes relativement aux chaînes de longueur moyenne (environ de 9 à 18 résidus de glucose) (Exemple 2).

Les auteurs de la présente invention ont en outre montré que ce mutant était dépourvu d'une protéine de 62kD normalement présente chez les souches sauvages de *Chlamydomonas reinhardtii*, et ont identifié cette protéine comme étant une 4- $\alpha$ -D-glucanotransférase (enzyme D) (Exemple 3).

Les auteurs de la présente invention ont enfin mis en évidence une nouvelle fonction polymérase de l'enzyme D vis-à-vis de l'amylopectine (Exemple 4).

#### **EXEMPLE 1 :**

##### **Isolement du mutant *sta 11* de *Chlamydomonas reinhardtii***

Sélection de la souche JV45J de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Au cours d'une mutagenèse UV (12 % de survie) réalisée sur la souche sauvage de référence 137C de *Chlamydomonas reinhardtii*, 5.10<sup>4</sup> plages cellulaires carencées en azote ont été criblées par une méthode de vaporisation d'iode (Delrue et al., 1992). Toutes les souches renfermant moins de 20 % de la quantité normale d'amidon accumulée par la souche 137C sont repérées par leur coloration jaune et ont été caractérisées. Un échantillon de cinq souches sauvages et sept mutants est inoculé en plage cellulaire sur un milieu carencé en azote. Les plages ont été vaporisées à deux reprises après cinq jours d'incubation en lumière vive continue. Les plages jaunes contiennent moins de 12 % de la quantité d'amidon accumulées par les plages noires. La teinte olive observée chez certaines plages peu colorées suggèrent l'existence d'un amidon résiduel enrichi en amylose. Parmi ces souches, ont été sélectionnées celles qui affichaient une complémentation en trans avec des mutants porteurs de *sta-1*, *sta6-1 :: ARG7*, *sta7-1::ARG7*, *sta5-1* qui sont défectueux pour les loci codant

pour la grosse et la petite sous-unité de l'AGPase (*STA1* et *STA6*) pour l'isoamylase de 88 kDa (*STA7*) ou pour la phosphoglucomutase plastidiale (*STA5*). Seule une souche parmi les  $5.10^4$  colonies (JV45J) faisant preuve d'une réduction de 90 à 95 % de la quantité d'amidon synthétisée en conditions d'accumulation (carence en azote) a été retenue après cette sélection. Ce mutant a ensuite été croisé avec une souche sauvage et 257 produits de méiose ont respectivement classé en 119 souches de phénotype mutant pour 128 clones d'aspect sauvage.

Un nouveau type de mutant (JV45J), qui accumule 4 % de la quantité normale en amidon, a ainsi pu être isolé. Le caractère responsable du phénotype défectueux se comporte comme un caractère récessif mendélien au vu de la ségrégation après croisement, et définit un nouveau locus génétique nommé *STA11*, puisque la mutation complémente en trans et recombine avec l'ensemble des déficiences testées.

## **EXEMPLE 2 : Caractérisation des polysaccharides du mutant *sta11***

Les polysaccharides présents dans les souches porteuses de *STA11* ont été isolés. En plus de l'amidon granulaire, les mutants *sta11-1* accumulent une quantité équivalente (5 %) de glucanes solubles, les malto-oligosaccharides de petite taille (figure 3A).

La présence simultanée d'une fraction d'oligosaccharides et du phénotype "pauvre en amidon" a été retrouvée dans toutes les souches portant la mutation *sta11-1* (n=50). La structure résiduelle de l'amidon granulaire a été mesurée par différentes techniques incluant l'analyse d'une diffraction grand-angle aux rayons X, la microscopie électronique à transmission (TEM) et la microscopie électronique à balayage (SEM), la séparation de l'amylose et l'amylopectine par chromatographie sur gel filtration, la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) du proton et le débranchement enzymatique sur l'amylose et l'amylopectine ainsi purifiées.

### 1. L'amidon granulaire

L'amidon granulaire et les glucanes solubles ont été analysés séparément. L'amidon dispersé dans le DMSO aqueux et délipidé par une précipitation avec quatre volumes d'éthanol a été resuspendu dans 10 mM NaOH pour être ensuite fractionné par chromatographie de tamisage moléculaire sur gel de sépharose CL2B.

#### a) Composition en amylose et amylopectine (filtration sur gel).

La séparation de l'amylopectine et de l'amylose est opérée par gel filtration de la souche mutante JV45J et la référence sauvage 137C. L'amidon dissous dans 10 mM NaOH a été fractionné par chromatographie de tamisage moléculaire selon la méthode décrite par Delrue et al. (1992). Un échantillon de chaque fraction a été coloré à l'iode et le spectre complet du complexe polysaccharide-iode a été enregistré. Des dosages à l'amyloglucosidase ont révélé la présence de 30 % d'amylose (15 % pour la référence sauvage). Relativement à la souche sauvage, l'amylopectine est caractérisée par une  $\lambda_{\max}$  du complexe polysaccharide-iode qui s'est accru de 20 à 30 nm (de 550 à 570-580 nm). Cette dernière caractéristique est retrouvée dans un grand nombre d'amidons enrichis en amylose.

#### b) forme des granules et structure cristalline

Les diffractogrammes des rayons X montrent un changement du réseau cristallin du type A sauvage de forte cristallinité vers un mélange de types A et B de cristallinités beaucoup plus faibles. La forme des granules est particulièrement altérée et leur taille globale est réduite. En fait, la souche sauvage présente globalement des grains à surface lisse tandis que le mutant présente des grains de taille plus réduite avec une surface de grains rugueuse et irrégulière.

### 2. Les glucanes solubles : malto-oligosaccharide de petite taille

La fraction des glucanes solubles (WSP) a été soumise à une triple extraction au méthanol chloroforme. La phase aqueuse a été lyophilisée et le culot sec redissous dans un tampon et fractionné par chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne de TSK-HW-50 comme l'ont décrit Mouille et al., 1996. Contrairement aux fractions solubles (WSP) purifiées à partir de

mutants déficients en isoamylase, aucun phytoglycogène ou autre polysaccharide soluble de masse importante n'a été trouvé. Par contre, la fraction WSP accumulée par les mutants *sta11* est constituée exclusivement par des oligosacharides peu ramifiés (moins de 1, 5 % de branchements) de faible masse (figure 3A).

### **EXEMPLE 3 : Mise en évidence d'une modification d l'amylopectine.**

#### **1. Débranchement enzymatique à l'isoamylase**

Les fractions amylose et amylopectine obtenues par chromatographie de tamisage moléculaire ont ensuite subi un débranchement enzymatique à l'isoamylase suivi d'une séparation électrophorétique des chaînes débranchées. Les résultats illustrés par la figure 3 établissent la nouveauté de la structure présentée par l'amylopectine de la souche JV45KJ. En effet, l'amylopectine présente un accroissement en chaînes traditionnellement absent de la structure.

Un marquage par l'APTS (acide 8-amino-1,3,6-pyrènetrisulfonique) a été effectué sur les extrémités réductrices avant de séparer les chaînes en fonction de leur longueur sur gel de séquence. Alors qu'aucun changement n'est détecté au niveau de la distribution des longueurs de chaînes de l'amylose, une modification significative de la distribution des très courtes longueurs de chaînes est observée pour l'amylopectine (figure 3C comparée à figure 3B).

#### **2. Technique de zymogramme et étude enzymologique.**

La détection de la défectuosité a été réalisée selon une technique de zymogramme sous conditions dénaturantes (Mouille et al., 1996). De plus, une étude enzymologique détaillée a été effectuée en extraits bruts et semi-purifiés pour toutes les enzymes connues susceptibles de participer à la biosynthèse de l'amidon.

Cette étude implique des mesures quantitatives et qualitatives des activités enzymatiques, parallèlement à des caractérisations cinétiques et des analyses des profils d'élution sur colonnes Mono-Q échangeuse d'anion

(chromatographie FLPC). Les enzymes testées sont les suivantes : ADP-glucose pyrophosphorylase, phosphoglucomutase, amidon synthétase soluble I, amidon synthétase soluble II, amidon synthétase liée au granule, enzymes de branchement (deux types), enzymes de débranchement (pullulanase et isoamylase), phosphorylases et toutes les hydrolases de l'amidon qui peuvent être détectées dans des gels de zymogramme contenant de l'amidon. Aucune différence qualitative ou quantitative de ces activités enzymatiques n'a co-ségré avec le gène mutant.

Lors de la réalisation de zymogrammes en conditions dénaturantes, l'absence d'une bande de 62 kD se colorant en rouge foncé à l'iode a été visualisée dans les produits de méiose portant la mutation *sta11-1* sur zymogramme en présence d'amidon ou d'amylopectine alors que cette bande de 62 kD apparaît distinctement chez les ségrégeants sauvages (n=75). Selon la technique mise au point par Mouille et al., 1996), le polysaccharide d'une bande de gel a été élué, le produit a été soumis à une analyse RMN. Le spectre du proton de l'amylopectine incubée s'était considérablement modifiée. En fait, le signal bimodal du proton, initialement de 5,3 à 5,2 ppm a été remplacé par un signal monomodal à la même position de 5,2 ppm, dans les conditions standard de RMN.

### 3. Purification de l'enzyme et activité de transfert de glucanes.

Une purification nécessite 20 litres de culture d'une souche sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii* en milieu TAP (Harris, 1989) pendant trois jours afin d'obtenir une densité cellulaire de  $2 \times 10^6$  cellules par ml. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes, le culot cellulaire est passé deux fois à la presse de French et immédiatement congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Cet extrait brut décongelé est centrifugé 20 minutes à 1000 rpm à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les protéines de l'extrait (350 à 500 mg) sont dosées par la méthode de Bradford (kit de dosage Bio-rad).

Le surnageant est précipité par de la protamine sulfate 5 % (40  $\mu\text{l}$  par ml d'extrait 15 minutes dans la glace) puis centrifugé à 10000 rpm pendant 20 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ .

Le surnageant (200 à 400 mg de protéines) est injecté grâce à un programme de multi-injections sur une colonne échangeus d'ions MonoQ

(Pharmacia HR 10/10 d'un volume de 9 ml, débit : 2 ml.min<sup>-1</sup>) équilibrée dans un tampon acétate de sodium 50 mM, DTT 2 mM (pH 6 par l'acide acétique).

La fraction non retenue (40 à 70 mg) subit une première précipitation au sulfate d'ammonium 30 % (176 mg/ml) 45 minutes à 4°C puis est centrifugée à 1 000 rpm pendant 20 minutes.

Le surnageant (30 à 60 mg) est ensuite précipité à 50 % 45 minutes à 4°C (126 mg/ml) puis est centrifugé à 10000 rpm pendant 20 minutes.

Le culot (10 à 20 mg de protéines) est resuspendu dans 2 ml de tampon acétate de sodium 50 mM, DTT 2 mM pH 6 puis injecté sur gel filtration S 100 (FPLC ; Pharmacia séphacryl 2,6 x 60 cm ; débit : 2 ml.min<sup>-1</sup> ; volume de fraction : 2 ml ; support alkyl dextran ponté par du N,N' méthylène bisacrylamide ; gel sphérique d'un diamètre de 25 à 75 µm ; gamme de fractionnement : 1000 à 10000) équilibrée dans le même tampon. Les fractions d'intérêt sont collectées 30 minutes après l'injection puis repérées par révélation de l'activité sur zymogrammes selon la technique décrite par Mouille et al., (1996). L'enzyme d'intérêt est retrouvée dans les fractions 14 à 26. Ces fractions sont rassemblées et concentrées à l'aide d'une colonne échangeuse de cations UnoS12 commercialisée par Bio-Rad (gel d'un volume de 15 x 68 mm greffé de groupes d'acide sulfonique) dans un tampon acétate de sodium 50mM, DTT 2 mM. L'enzyme disproportionnante est éluée par un gradient continu de NaCl (tampon acétate de sodium 50 mM, NaCl 1 M) et l'enzyme est récupérée dans les fractions correspondant à l'élution par le NaCl 50 %.

Toutes les colonnes sont effectuées en FPLC sur un appareil Pharmacia LCC-500.

L'enzyme pure a reproduit les effets observés sur l'amylopectine par RMN du proton. L'incubation d'amylopectine avec l'enzyme pure a conduit des changements importants dans la distribution des chaînes longues de l'amylopectine (figure 3D). L'action sur l'amylopectine a pu être précisée par débranchement du produit incubé avant et après traitement à la β-amylase.

Comme les β-amylases sont des enzymes processives qui digèrent sélectivement les chaînes extérieures des polysaccharides, le résultat obtenu montre que les modifications majeures sont restreintes aux chaînes externes du polymère. Il est important de noter qu'aucun oligosaccharide n'est libéré dans le processus alors que la quantité de liaisons α-1,6 reste constante. L'enzyme d

62kD est donc une  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase dont la fonction est de cliver les liaisons  $\alpha$ -1,4 présentes sur les chaînes externes du donneur amylopectine pour les transférer aux extrémités non réductrices de chaînes voisines extérieures de l'accepteur. Dans les plantes, les seules  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases connues pour être présentes lors de la synthèse de l'amidon, sont communément appelées enzymes D. Elles sont connues pour agir sur des oligosaccharides solubles longs d'au moins trois résidus glucose (maltotriose) pour donner des oligosaccharides de longueurs variables aux dépends de la formation du glucose. La réaction consiste en un clivage d'un glucane donneur et un transfert sur une chaîne récepteur.

L'action de l'enzyme de 62 kD identifiée a parallèlement été testée sur le glucose, le maltose, le maltotriose, le maltotetraose, le maltopentaose, le maltohexaose et le maltoheptaose : l'enzyme dispropotionne avec succès tous les oligosaccharides plus longs que le maltose et le glucose, sur lesquels elle n'a aucune action. Ses effets sur le maltotriose ont été décrits à la figure 3E. Les très faibles quantités de maltose dans tous les cas confirment que l'enzyme obéit aux règles présentées précédemment définissant l'action des enzymes dispropotionnantes.

#### **EXEMPLE 4 :**

##### **Nouvelle fonction polymérase de l'enzyme D**

Des oligosaccharides sont marqués radioactivement au  $^{14}\text{C}$  par débranchement *in vivo* de l'amylopectine marquée. Il a été vérifié qu la distribution de la longueur des chaînes dans le mélange des chaînes débranchées correspondait à celle présentée à la figure 3B.

L'incorporation des oligosaccharides dans l'amylopectine (figur 4) ou le glycogène de foie de lapin a été mesurée avec succès, à des concentrations physiologiques en maltooligosaccharides. En effet, l'enzyme D a manifesté une activité polymérase très efficace sur le glycogène et sur l'amylopectine. Les substrats et produits de la réaction ont été séparés par chromatographie de tamisage moléculaire en gel de TSK-HW-50 (glycogène) ou en sépharose CL2B.

L'incorporation du marquage des maltooligosaccharides sur l'amylopectine fournit un essai plus fiable sur l'activité de l'enzyme D comparativement à la production de glucose.

Il a par ailleurs été mis en évidence que la polymérisation *in vitro* était localisée sur les chaînes externes de l'amylopectine. En effet, le signal de radioactivité incorporée dans le polysaccharide disparaît lorsque l'amylopectine qui a subi l'incorporation des oligosaccharides est mise en présence de  $\beta$ -amylase, enzyme spécifique des chaînes externes de l'amylopectine.

### **EXEMPLE 5 :**

#### **Obtention de plantes de maïs transgéniques**

##### **A. Obtention et utilisation de cal de maïs comme cible pour la transformation génétique.**

La transformation génétique du maïs, quelle que soit la méthode employée (électroporation ; biolistique, microfibres, canon à particules), requiert généralement l'utilisation de cellules indifférenciées en divisions rapides ayant conservé une aptitude à la régénération de plantes entières. Ce type de cellules compose le cal friable embryogène (dit de type II) de maïs.

Ces cals sont obtenus à partir d'embryons immatures de génotype H1 II ou (A188 x B73) selon la méthode et sur les milieux décrits par Armstrong (1994). Les cals ainsi obtenus sont multipliés et maintenus par repiquages successifs tous les quinze jours sur le milieu d'initiation.

Des plantules sont ensuite régénérées à partir de ces cals en modifiant l'équilibre hormonal et osmotique des cellules selon la méthode décrite par Vain et al (1989). Ces plantes sont ensuite acclimatées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

##### **B. Utilisation du canon à particules pour la transformation génétique du maïs.**

Le paragraphe précédent décrit l'obtention et la régénération des lignées cellulaires à la transformation. On décrit ici une méthode de transformation génétique conduisant à l'intégration stable des gènes modifiés



dans le génome de la plante. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un canon à particules. Les cellules cibles sont des fragments de cals décrits dans le paragraphe A. Ces fragments d'une surface de 10 à 20 mm<sup>2</sup> ont été disposés, 4 heures avant bombardement, à raison de 16 fragments par boîte au centre d'une  
5 boîte de Pétri contenant un milieu de culture identique au milieu d'initiation, additionné de 0,2 M de mannitol + 0,2 M de sorbitol. Les plasmides portant les séquences nucléotidiques à introduire telles que l'ADNc codant pour l'enzyme D de la pomme de terre (Takada et al., 1993) ou les séquences antisens obtenues à partir de cet ADNc sont purifiées sur colonne Qiagen, en suivant les  
10 instructions du fabricant. Ils sont ensuite précipités sur des particules de tungsten (M10) en suivant le protocole décrit par Klein et al (1987). Les particules ainsi enrobées sont projetées vers les cellules cibles à l'aide du canon et selon le protocole décrit par J. Finner (1992).

Les boîtes de cals ainsi bombardés sont ensuite scellées à l'aide de  
15 ®Scellofrais, puis cultivées à l'obscurité à 27°C. Le premier repiquage a lieu 24 heures après, puis tous les quinze jours pendant trois mois sur milieu identique au milieu d'initiation additionné d'un agent sélectif. Les agents sélectifs utilisables consistent généralement en composés actifs de certains herbicides (®Basta, ®Roundup) ou certains antibiotiques (Hygromycine, kanamycine, ...).

20 On obtient après trois mois ou parfois plus tôt, des cals dont la croissance n'est pas inhibée par l'agent de sélection, habituellement et majoritairement composés de cellules résultant de la division d'une cellule ayant intégré dans son patrimoine génétique une ou plusieurs copies du gène de sélection. La fréquence d'obtention de tels cals est d'environ 0,8 cal pour boîte  
25 bombardée.

Ces cals sont identifiés, individualisés, amplifiés puis cultivés de façon à régénérer des plantules. Afin d'éviter toute interférence avec des cellules non transformées, toutes ces opérations sont menées sur des milieux de culture contenant l'agent sélectif.

30 Les plantes ainsi régénérées sont acclimatées puis cultivées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

C. Utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* pour la transformation génétique du maïs.

La technique utilisée est décrit par Ishida et al., 1996.

**BIBLIOGRAPHIE**

- An G.(1986), Plant Physiol. 81 : 86-91
- 5    - Armstrong et al., (1994), Maize handbook ; M. Freeling, V. walbot Eds, 665-671
- Bensen et a l., Janvier 1995, The Plant Cell, Vol. 7, 75-84
- 10   - Buléon et al., (1997), Plant Physiol., 115 :949-957
- Das et al., March 1995, The Plant Cell, Vol. 7, 287-294
- Delrue et al., (1992), J. Bacteriol., 174, 3612-3620
- 15   - Depicker et al., (1982) J. Mol. Appl. Genet., 1, 561-573
- Finner J. et al., (1992), Plant Cell Reports, 11, 323-328
- 20   - Franck et al., (1980) Cell. 21,285-294
- Fromm M.E., Taylor L.P., Walbot V., (1986) Nature, vol. 319, 791-793
- Gaubier et al., Mol. Gen., 238, 409-418 (1993)
- 25   - Ishida et al., (1996), Nature biotechnology, 14, 745-750
- Jouanin, Plant. Sci., 53, 53-63 (1987)
- 30   - Harris et al. (1989) San Diego : Academic Press, 25-63
- Haseloff et al., Nature 334, 585-591, 1988
- Kay, Science, (1987) 236, 1299-1302
- 35   - Klein et al., (1987), Nature, 327, 70-73

- Mc Elroy (1991) Mol. Gen. Genet. 231 : 150-160
- 5 - McClintock, B. 1950, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 36, 344-355
- Mouille et al., (1996), Plant Cell 8, 1353-1366
- Ni et al., Plant J., (1995) 7, 661-676
- 10 - O'Shea et al. (1996), electrophoresis 17, 681-688
- Sanford J.C., (1988) Trends in Biotechnology, 6, 299-302
- 15 - Takaha et al., 1993, J. Biol. Chem. vol. 268, n° 2, 1391-1396
- Takada et al., 1998, Planta, vol. 205, n° 3, 445-451
- Vain et al., (1989), Plant Cell Tissue and Organ Culture, 18, 143-151.
- 20 - Watson et al., ADN recombinant, Ed. De Boeck Université, p 273-292
- Whistler et al., (1967), Starch : chemistry and technology II – Industrial aspects, Academic press, 432-458.
- 25

## **REVENDICATIONS**

5           1.       Procédé d'obtention de plantes ou parties de plantes produisant un amidon modifié dans lequel on augmente ou on diminue le taux d'enzyme D dans les cellules de ladite plante, ledit amidon modifié différant de l'amidon produit naturellement par les plantes par la distribution de la longueur des chaînes de l'amylopectine.

10           2.       Procédé selon la revendication 1 dans lequel on diminue le taux d'expression d'enzyme D endogène de façon à conduire à la production d'amidon comprenant une amylopectine présentant un enrichissement des chaînes comportant moins de 6 résidus de glucose.

            3.       Procédé selon la revendication 2 comprenant les étapes consistant à :

15           a) construire un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique antisens du gène codant pour ladite enzyme D endogène;

            b) transformer une cellule de plante avec ledit vecteur d'expression ;

20           c) régénérer la plante à partir de la cellule transformée à l'étape b, ladite plante transgénique ainsi obtenue produisant un amidon comprenant une amylopectine présentant un enrichissement des chaînes comportant moins de 6 résidus de glucose.

25           4.       Plante ou partie de plante, telle que notamment pomme de terre, blé, maïs ou riz, produisant de l'amidon modifié différant de l'amidon produit naturellement par les plantes par la distribution de la longueur des chaînes de l'amylopectine, ladite plante ou partie de plante étant obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes.

30           5.       Procédé d'obtention d'amidon modifié différant de l'amidon produit naturellement par les plantes par la distribution de la longueur des chaînes de l'amylopectine, dans lequel :

            - on extrait l'amidon modifié à partir des plantes ou parties de plantes selon la revendication 4 ;

            - ou on procède à l'extraction et à la solubilisation de l'amidon de plantes ou parties de plantes, puis on met en contact ledit amidon solubilisé avec

une enzyme D, en présence d'autres polysaccharides ou oligosaccharides éventuellement modifiés.

6. Amidon modifié obtenu selon le procédé de la revendication 5.

5 7. Utilisation d'amidon modifié selon la revendication 6 pour la préparation de produits dérivés, notamment de produits alimentaires.

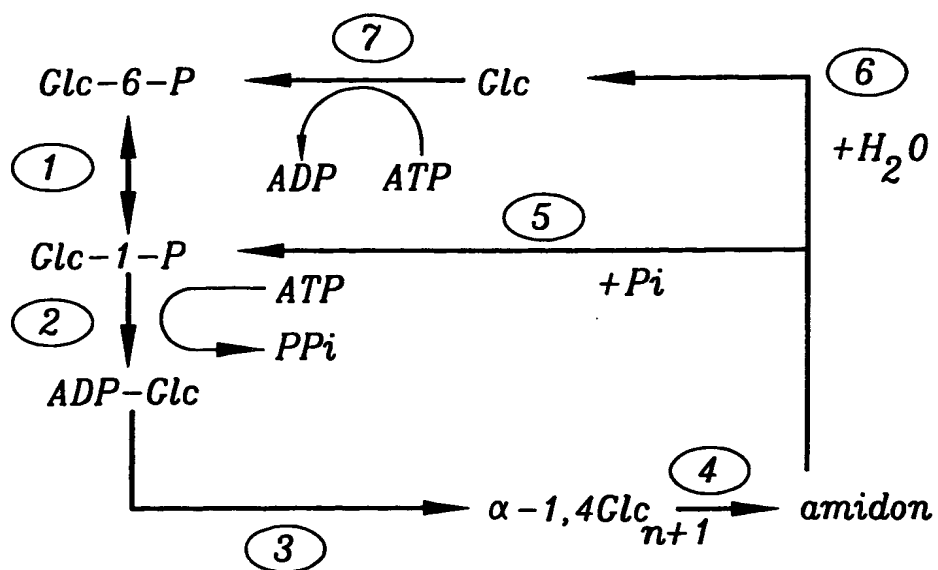
8. Produits contenant un amidon modifié selon la revendication 6.

10 9. Enzyme D de *Chlamydomonas reinhardtii* purifiée par le procédé comprenant les étapes consistant à :

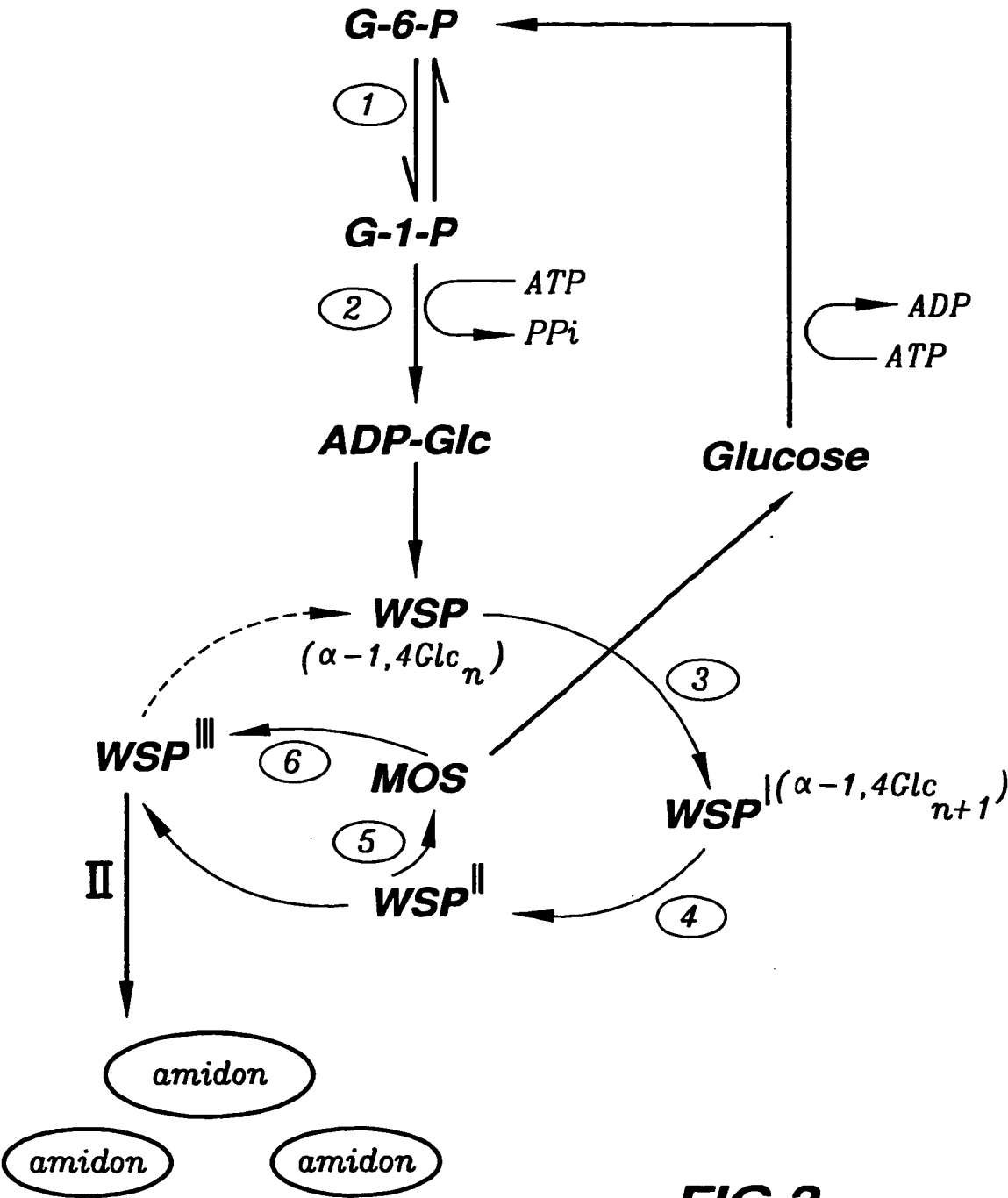
- centrifuger la souche *Chlamydomonas reinhardtii*;
- précipiter la fraction acellulaire au sulfate de protamine ;
- passer le surnageant obtenu à l'étape précédente sur une chromatographie d'échange d'anions ;
- 15 - soumettre la fraction non retenue à l'étape précédente à une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium ;
- soumettre le surnageant obtenu à l'étape précédente à une chromatographie de tamisage moléculaire ;
- concentrer par une chromatographie d'échange de cations le culot
- 20 obtenu à l'étape précédente.

10. Procédé selon la revendication 1 dans lequel on augmente le taux d'enzyme D active présente par l'expression de l'enzyme D de *Chlamydomonas reinhardtii* purifiée selon la revendication 9.

1/4

**FIG.1**

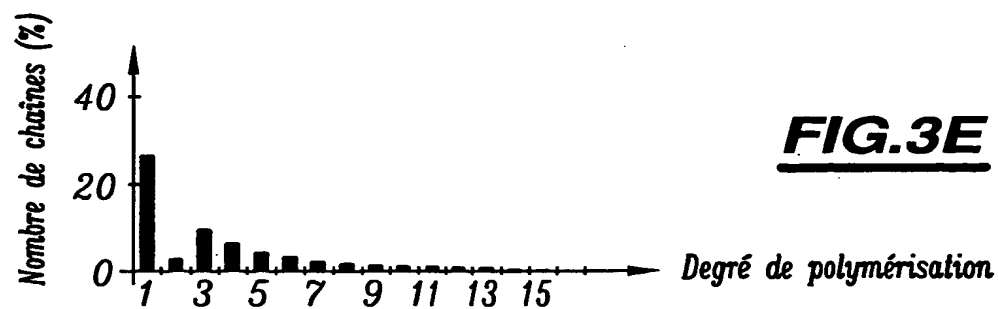
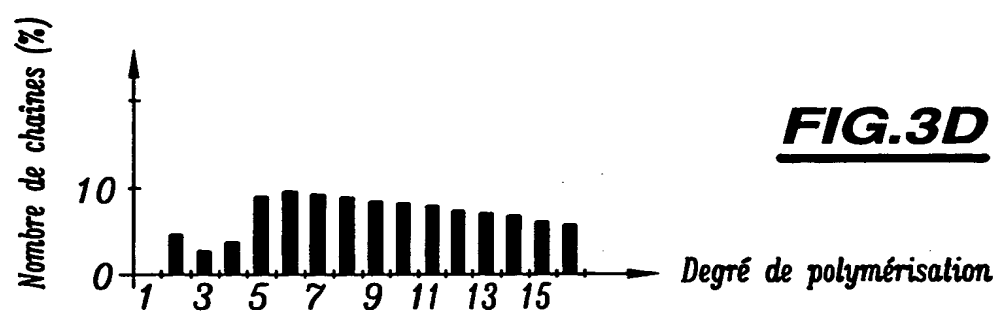
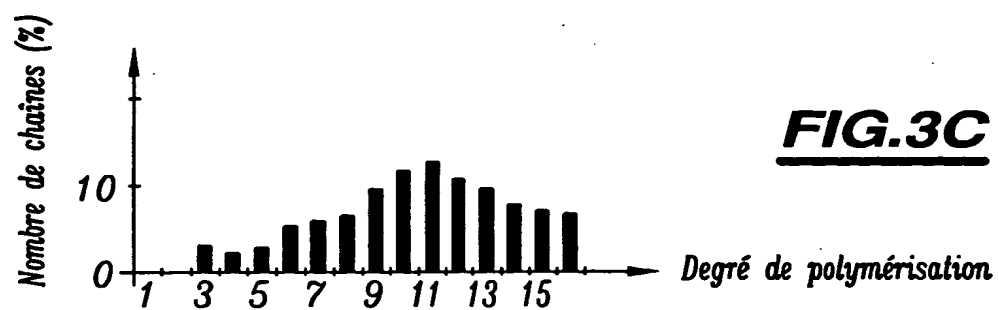
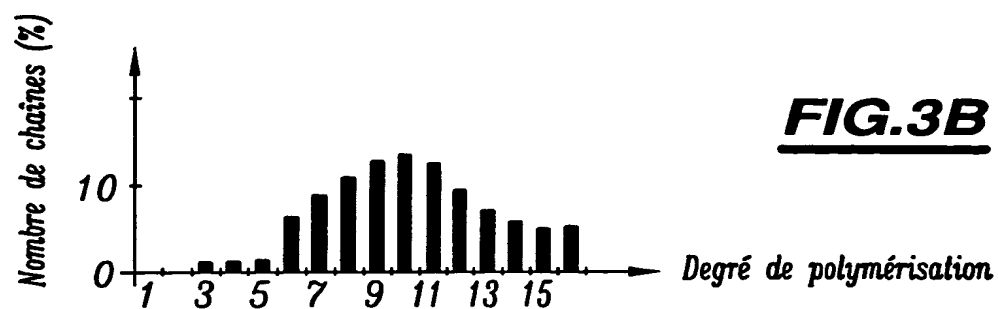
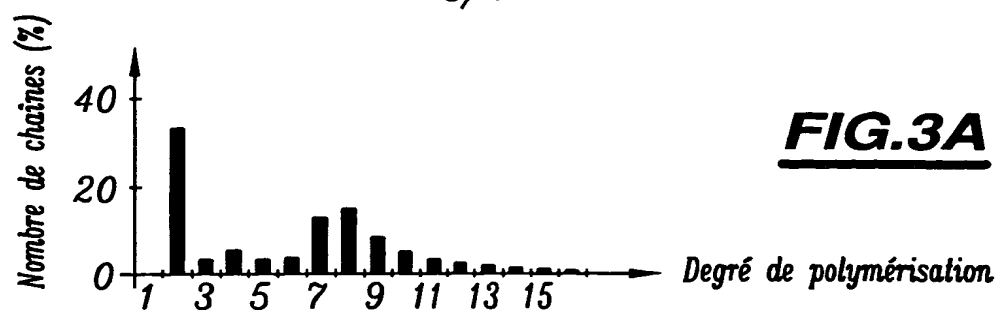
2/4



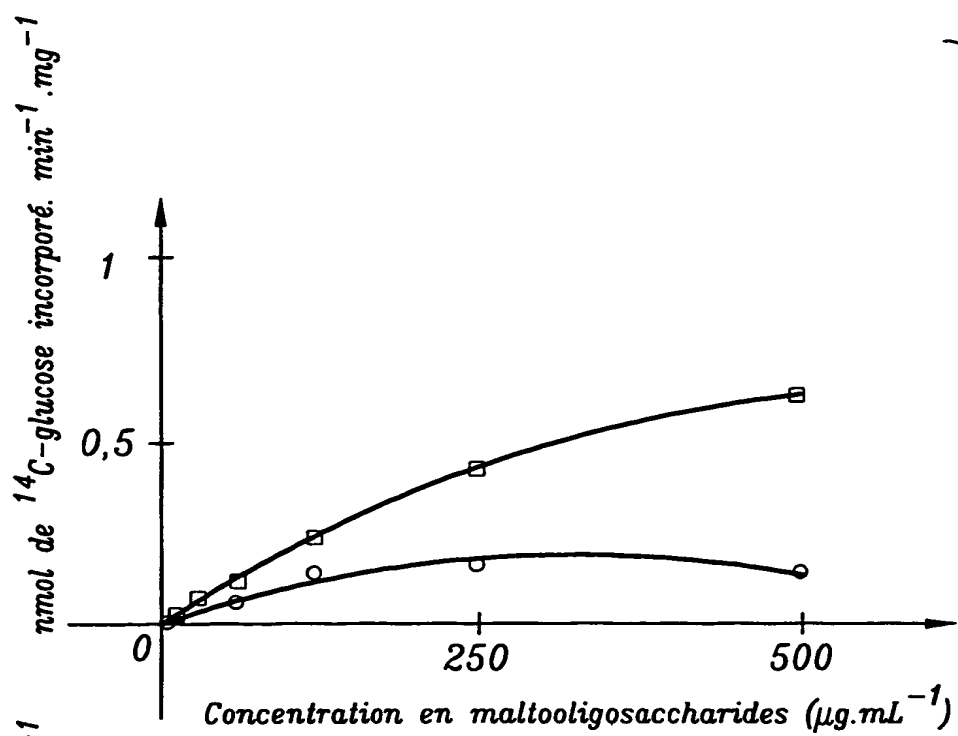
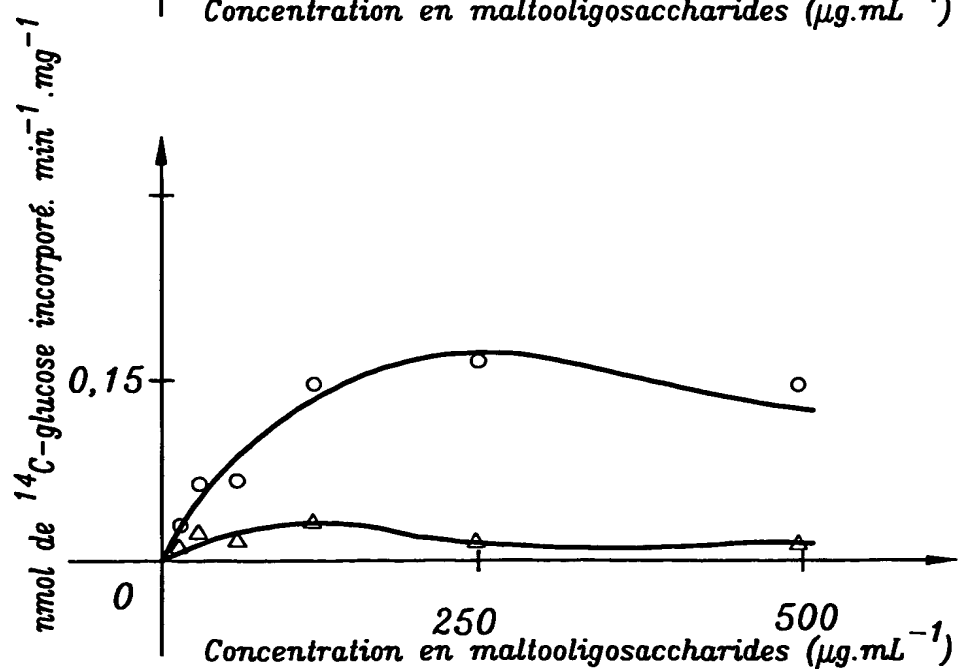
**FIG.2**



3/4



4/4

**FIG.4**

- 2,5 mg/ml amylopectine
- 1 mg/ml amylopectine
- △ 0,25 mg/ml amylopectine